

S37 1 PN=JP 55010581  
? t 37/9

37/9/1  
DIALOG(R) File 347:JAPIO  
(c) 1998 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

00522981  
ENZYME ELECTRODE

PUB. NO.: 55-010581 [JP 55010581 A]  
PUBLISHED: January 25, 1980 (19800125)  
INVENTOR(s): NANKAI SHIRO  
NAKAMURA KENICHI  
IIJIMA TAKASHI  
APPLICANT(s): MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD [000582] (A Japanese Company  
or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 53-084469 [JP 7884469]  
FILED: July 10, 1978 (19780710)  
INTL CLASS: [3] G01N-027/30; G01N-027/40; C12Q-001/00  
JAPIO CLASS: 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY --  
Microorganism Industry); 42.9 (ELECTRONICS -- Other)  
JAPIO KEYWORD: R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)  
JOURNAL: Section: P, Section No. 4, Vol. 04, No. 39, Pg. 36, March 28,  
1980 (19800328)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To secure a quick and simple measurement of the substrate density as well as to realize the continuous and repetitive use of the enzyme electrode by using the graphite for the electron conducting material and thus giving the electrochemical activity to the substrate which suffers the peculiar catalyst function of the enzyme.

CONSTITUTION: The powder of the high-purity graphite of over 99.5 wt% of fixed carbon and under 0.005 wt% of ash content is mixed with the insoluble redox compound such as the chloranil conjugating the oxidoreductase to be then press-formed. Then the oxidoreductase like glucose oxidase is fixed on the moldings obtained via, for example, glutaric aldehyde. Such enzyme electrode 7 is mounted to electrode support 6 and then soaked into phosphoric acid buffer solution 8 containing pH5.6 glucose (which is the substrate) along with reference electrode 3. The opposite electrode 5 is connected to potentiostat 2 via electrode 7, reference electrode 3 and salt bridge 4 each, and the change of the oxide current is recorded on recorder 1.

## ⑰ 公開特許公報 (A)

昭55—10581

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 27/30  
27/40  
// C 12 Q 1/00

識別記号

序内整理番号  
7363—2G  
7363—2G  
7349—4B

⑯ 公開 昭和55年(1980)1月25日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

## ④酵素電極

②特 願 昭53—84469

②出 願 昭53(1978)7月10日

②發明者 南海史朗

門真市大字門真1006番地松下電器産業株式会社内

②發明者 中村研一

②發明者 飯島孝志

門真市大字門真1006番地松下電器産業株式会社内

②出願人 松下電器産業株式会社

門真市大字門真1006番地

②代理人 弁理士 中尾敏男 外1名

## 明細書

## 1、発明の名称

酵素電極

## 2、特許請求の範囲

(1) 固定化された酸化還元酵素と、これに共役するレドックス化合物および電子伝導性物質を有し、前記電子伝導性物質が黒鉛であることを特徴とする酵素電極。

(2) 酸化還元酵素の補酵素が固定化された特許請求の範囲第1項記載の酵素電極。

(3) 黒鉛が、固定炭素99.5重量%以上で灰分が0.005重量%以下の高純度黒鉛である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の酵素電極。

(4) レドックス化合物が、不溶性レドックス化合物である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の酵素電極。

## 3、発明の詳細な説明

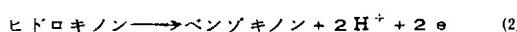
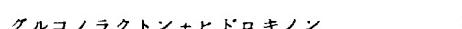
本発明は、酵素の特異的触媒作用を受ける基質に対して電気化学的活性を有し、基質の濃度を迅速かつ簡便に測定することができ、しかも連続使

用、繰り返し使用のできる酵素電極を得ることを目的とする。本発明は、また、酸素電極などと組み合わせることにより、基質のもつ化学エネルギーを電気エネルギーに変換する電池に用いられる酵素電極に関する。

近年、種々の酵素の利用技術の進歩に伴い、これら酵素の有する特異的触媒作用を工業的に利用する試みが行なわれている。その一例として、酵素と特異的に反応する物質である基質濃度を検出することが試みられている。

酵素反応を電気化学反応として取り扱うには、例えば酵素反応系にこれと共役する適当なレドックス化合物を介在させ、このレドックス化合物の酸化還元反応を電気化学的に検出する方法が用いられている。その一例として、基質としてグルコース、酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ、レドックス化合物としてベンゾキノンを用いた場合には次の(1)及び(2)式で示される反応を、電極を挿入した混合液中で行なわすことができる。

グルコース+ベンゾキノン  $\xrightarrow{\text{グルコースオキシダーゼ}}$



(1)式における還元生成物であるヒドロキノンを(2)式で電気化学的にベンゾキノンに酸化し、グルコース濃度をこのときの酸化電流として検出することができる。

しかし実用的な面からは、高価な酵素やレドックス化合物を一体固定化することにより、繰り返し使用可能な取り扱いの簡単な酵素電極とすることが望ましい。酵素、レドックス化合物を一体固定化するためには、集電体としての適当な電子伝導性物質を必要とする。中でもカーボンは、金属<sup>膜</sup>と異なり陽極酸化時に溶解したり不動態を生成したりすることなく、電極材料として安定な性質を有しており、好適な電子伝導性物質である。

カーボンを用いた酵素電極は、その一例として、カーボン粉末とレドックス化合物の混合物をプレス成型し、この成型体上に酵素を固定化する方法、

あるいは前記混合物中に、予め酵素を固定化したカーボン粉末を混合しておき、その後成型体とする方法などにより構成することができる。

測定方法としては、前記電極を緩衝液中で飽和カロメル電極に對し一定電位に保つておいて、基質濃度を変化させ、このときのアノード電流の変化量を測定する。この様な測定における課題として以下の点があげられる。すなわち、電極を一定電位に設定してから測定可能な状態となるまでに要する時間、および被検溶液中に対象基質が含まれないときに流れる残余電流の大きさである。これらはいずれも酵素電極を使用する上で、簡便性、迅速性、あるいは検出感度、S/N比を決定づける重要なポイントである。

酵素電極の構成材料である電子伝導性物質としてのカーボン粉末には、アセチレンブラック、黒鉛粉末などが用いられる。しかしながら、これらカーボン中には、重金属をはじめとする多くの不純物が含まれており、特にアセチレンブラックなどは、表面積も大きく、表面に活性な官能基を有し

ている。電子伝導性物質としてこれらのカーボンを用いた場合には、カーボン中に含有される不純物および表面の活性な官能基などの酸化還元に基づく電流が流れため、測定上の大きな支障となる。さらには、重金属イオンは多くの酵素反応に対し、阻害物質として作用するため、カーボン中に、不純物として重金属が含まれることは望ましくない。

本発明は、電子伝導性物質として、黒鉛を用いることにより、酵素電極の性能を向上するものである。特に、固定炭素99.5重量%以上で灰分0.005重量%以下の高純度黒鉛を使用することにより、残余電流を大幅に低減することができるなど、その性能を飛躍的に高めることができる。

以下本発明をその実施例により説明する。

酵素電極は次に述べる方法により作製した。カーボン粉末と不溶性レドックス化合物としてクロルアニルを重量比で4:1の割合で十分混合し、プレス成型する。得られたプレス成型体上に酵素としてグルコースオキシダーゼをグルタルアルデ

ヒドで固定する。こうして得られた酵素電極を電極支持体に装着し、第1図に示す測定系で測定に供した。図中1は記録計、2はボテンショスタット、3は参照極、4は塩橋、5は対極、6は酵素電極Aを装着した電極支持体、8は基質であるグルコースを含むpH 5.6のリン酸緩衝液である。

第2図に電子伝導性物質として各種のカーボン粉末を用いた場合のそれぞれの酵素電極の基質を含まない液中において+0.40Vに電位を設定した後の残余電流と時間の関係を示す。図中Aはアセチレンブラック、Bは固定炭素99.0重量%以上で灰分0.2重量%以下の人造黒鉛、Cは固定炭素99.5重量%以上で灰分0.005重量%以下の高純度黒鉛、Dは固定炭素99.5重量%以上で灰分0.001重量%以下の高純度黒鉛をそれぞれ電子伝導性物質として用いた場合である。

図からも明らかなどとく、Aにおいては残余電流が減少して定常値に達するまでに長時間を要するが、黒鉛を用いたB、C、Dでは電位設定後、5~8分でほぼ定常値に達しており、またその残

効果が大である。

本発明は、実施例で説明したグルコースオキシダーゼについて限定されることはなく、酸化還元酵素とレドックス化合物を共役させ、その酸化還元電流を検出するいかなる酵素電極系においても適用することができる。また、アルコール脱水素酵素などのように補酵素を必要とする酵素系の場合には、ニコチンアミドアデニジヌクレオチド(NAD)などの酵素に対応する補酵素をさらに加えて固定化すればよい。レドックス化合物としてはクロルアニルの他ブルムアニル、あるいは各種レドックスポリマーなどの不溶性レドックス化合物を用いることにより、繰り返し使用の可能な、酵素電極とすることができる。



余電流も A に比較して十分に小さい値となっている。そして、これらの傾向は高純度の黒鉛を用いた C, D において特に顕著である。

第3図は前記 A ~ D の酵素電極について、電位設定 30 分後の残余電流が定常値となった時点でグルコースを添加し、その濃度を  $2 \times 10^{-4}$  モル/lとしたときの応答特性を示す。酵素が存在しないときには、図に示す様な電流増加は認められない。図から明らかなどとく、A ~ D いずれの電極においても電流増加にほとんど差はないが、応答電流(電流増加)と残余電流の大きさを比較すると、A と B, C, D との差は明らかである。C, D においては、残余電流が特に小さいため、さらに低濃度の基質をも感度よく検出することができる。

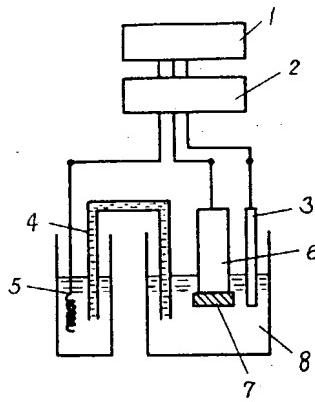
以上のごとく、電子伝導性物質として用いるカーボンにより、酵素電極の性能が左右されるが、黒鉛の使用により電極性能を大幅に向上することができ、中でも固定炭素 99.5 重量% 以上、灰分 0.005 重量% 以下の高純度黒鉛を用いた場合の

#### 4. 図面の簡単な説明

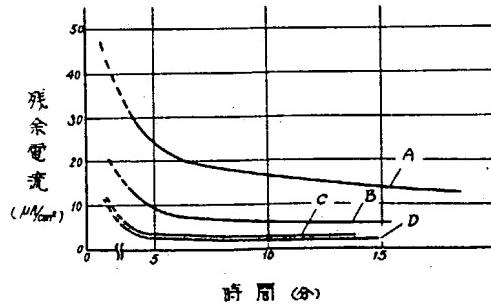
第1図は基質濃度の測定系の構成を示す図、第2図は各種酵素電極について電位設定後の残余電流の変化を比較した図、第3図は酵素電極のグルコースに対する応答特性を比較した図である。

代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか 1 名

第 1 図



第 2 図



第 3 図

